Keywords: a mink, aleutian disease, blood indicators, succinic acid.

Литература

. Берестов В.А., Клиническая биохимия пушных зверей. Петрозаводск: Карелия, 2005. 160 с.

2. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. Средство для профилактики и лечения алеутской болезни норок. Патент РФ № 2036654. 1995.

3. Слугин В.С. Болезни плотоядных пушных зверей. Киров, 2004. 592 с.

4. Слугин В.С. Алеутская болезнь норок. М., 1975.

5. Узенбаева Л.Б., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н., Мелдо Х.И., Бойков Ю.А. Мидийный гидролизат при алеутской болезни норок // Ветеринария. 1998. № 12. С. 21-23.

6. Хитрова Е.А., Беспалова Т.А., Сидоров Г.Н. Коррекция иммунного статуса здоровых норок и инфицированных вирусом алеутской болезни // Ветеринарная патология. 2007. № 3. С. 251-254.

Контактная информации об авторах для переписки

Беспятых Олег Юрьевич - кандидат биол. наук, доцент, ст. научный сотрудник

Березина Юлия Анатольевна – кандидат вет. наук, ст. научный сотрудник

Бельтюкова Зинаида Николаевна - кандидат вет. наук, ст. научный сотрудник

Окулова Ираида Ивановна - кандидат вет. наук, ст. научный сотрудник

Домский Игорь Александрович - доктор вет. наук, профессор, директор института

Журавлев Дмитрий Михайлович - кандидат вет. наук, ст. научный сотрудник

Контакты через Беспятых Олега Юрьевича e-mail: bio.vniioz@mail.ru

УДК.619:615

Фомин А.С., Малинин М.Л., Василенко О.А. , Габалов К.П. , Козлов С.В., Ласкавый В.Н., Волков А.А., Староверов С.А.,Богатырев В.А., Дыкман Л.А.

(Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова; ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН, г. Саратов; Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов)

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ТУБЕРКУЛИНА PPDHA КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: туберкулин, коллоидное золото, макрофаги, лимфоциты, проникновение

В современной науке вопросы, связанные с изучением механизмов взаимодействия низкоиммуногенных антигенов с клетками иммунной системы, остаются малоизученными.В большой степени это связано с антигенами, выделяемыми возбудителями хронических инфекций, т.к. в ряде случаев они могут обладать токсичным эффектом.

Роль белков-метаболитов, выделяемых микобактериями при переходе их в дормантное состояние в организме животного, до сих пор недостаточно изучена. Значение этих белков как для микроорганизма, так и для развития патогенетического процесса при взаимодействии микро- и макроорганизма, не вполне ясно.

Туберкулин является диагностическим препаратом, широко применяемым при диагностике туберкулеза в качестве кожного теста [12,14]. Но многие вопросы, связанные с механизмами воздействия туберкулина на организм животных и человека, остаются открытыми. Поэтому получение антител на туберкулин и изучение с их помощью взаимодействия туберкулина с им-

мунокомпетентными клетками является важной задачей современной ветеринарии и медицины.

Получение специфических антител на туберкулин связано с определенной сложностью, так как в его состав входит целый набор белков с молекулярной массой от 9 до 65 кДа[7,13]. Кроме того белок с молекулярной массой 9.7 кДа, входящий в состав туберкулина, способен вызывать ингибирование миграции макрофагов и частичное угнетение бласттрансформациилимфоцитов морских свинок и тем самым тормозить выработку антител [10].

В данной работе были поставлены задачи изучения механизмов взаимодействия туберкулина с клеткамиорганов ретикулоэндотелиальной системы лабораторных животных.

Материалы и методы

В качестве микробного антигена применяли препарат туберкулинаPPD (PurifiedProteinDerivate) (БИОК, Россия). Использование туберкулина в качестве антигена для наших исследований связано с его низкой иммуногенностью и хорошей изученностью антигенного состава [8]. Антигенную фракцию туберкулина получали методом высаливаливания сульфатом аммония. Затем методом гельфильтрациипроводили дальнейшую очистку выделенных белковых фракций с молекулярной массойот 10 до 26 кДа, чистоту которых проверяли SDS-электрофорезом в 20% ПААГ.

Конъюгирование туберкулина с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) проводили по общепринятой методике [3].

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов и клеток селезенки проводилось по стандартным методикам[2].

Исследуемые суспензии перитонеальных клеток и клеток селезенки разводили до конечной концентрации 1.0x10^{9} кл/мл. К 100 мкл полученных суспензийстерильнодобавляли туберкулин, меченный ФИТЦ, и культивировали (37°С 0.5% СО2) в течение 48 ч.После инкубации готовили влажные препараты для микроскопии.

При изучении влияния туберкулина на дыхательную активность клетокв качестве контроля использовались 100 мкл клеточных суспензий в 1 мл питательной среды. В качестве опыта использовались 100 мкл клеточных суспензий с туберкулином (7.5 мкг/мл) в 1 мл питательной средыс антигеном. Итоговая концентрация клеток составила 2x10^{7} клеток в 1 мл.

Определение дыхательной активности проводили по способности клеток восстанавливать нитротетразолевыйсиний до формазана по общепринятому методу [4]. Измерение количества восстановленного формазана проводили на программируемом фотометре BS3000P при длине волны 490 нм.

Микроскопические исследования проводили на микроскопе LeicaDM 2500 в режиме темного поля и флуоресценции и на конфокальноммикроскопеLeica TCS-SP5 (LeicaMicrosistems, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовались аргоновый лазер, излучающий на длинах волн 458 и 543 нм и гелий-неоновый лазер, излучающий на длине волны 633 нм.

Коллоидное золото (КЗ) со средним диаметром частиц (15 нм) получали, используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Средний размер частиц КЗ контролировали спектрофотометрически[6,9].

Приготовление конъюгатов коллоидного золота с туберкулином осуществляли по методу, предложенному Дыкманом Л.А. и соавторами [1].

Определения бактерицидной активности фагоцитирующих клеток проводили по следующей методике.В суспензии фагоцитов (1 106кл/мл), вносили туберкулин. Клетки культивировались при 37 С в течение трех часов, после чего в каждую пробу вносили суспензию живых бактерий E. coliБ-5 из расчета 25 КОЕ на один фагоцит. Пробы инкубировали при +4 С в течение 30 мин. После инкубации и центрифугирования (1000g, 10 мин) клетки дважды отмывали раствором Хенкса. Из каждогообразца проводили высев на плотную питательную среду для определения степени адгезии микроорганизмов.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований нами были получены следующие данные (рис. 1, 2).Туберкулин вызывает резкое угнетение дыхания перитонеальных макрофагов (ПК).Концентрация восстановленного формазана вПКв опыте составляла 0.25±0.05 мкг/мл, что значительно ниже, чем у контрольного образца (2.9±0.05 мкг/мл). На нефагоцитирующие клетки селезенки туберкулин не оказывал цитотоксического действия, концентрация восстановленного формазана в опыте и контроле составила 3.7±0 мкг/мл и 3.74±0.045 мкг/мл, соответственно.

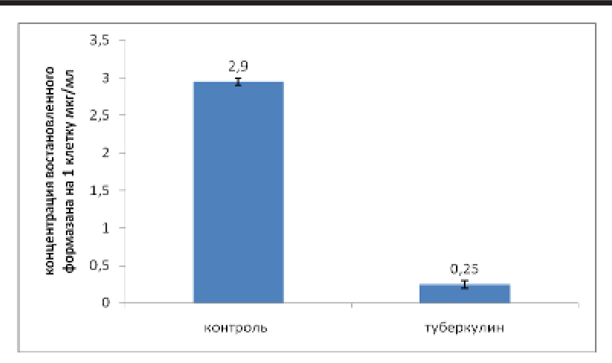


Рис.1. Концентрация формазана в перитонеальных клетках в тесте с нитротетрозолевым синим (P≤0,05)

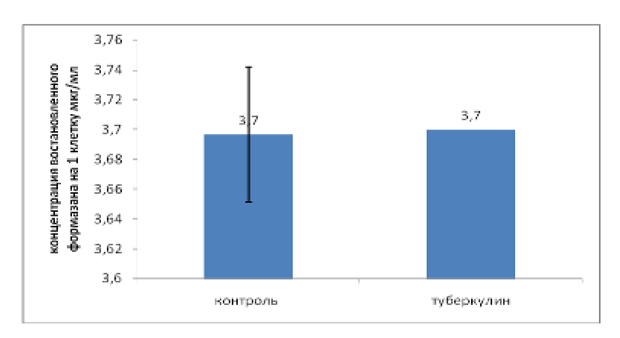


Рис.2. Концентрация формазана в клетках селезенки в тесте с нитротетразолевым синим

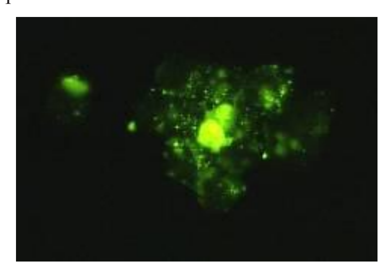


Рис. 3.Клетки селезенки, культивированные в присутствие туберкулина меченного ФИТЦ (зеленое свечение)

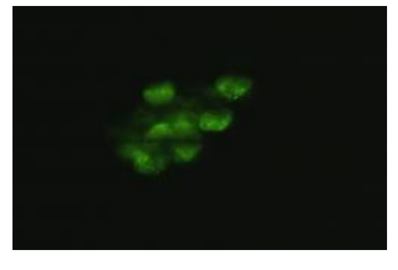


Рис.4.Перитонеальные клетки, культивированные в присутствие туберкулина меченного ФИТЦ (зеленое свечение)

На следующем этапе исследований предстояло выяснить, происходит ли проникновение туберкулина в исследуемые нами клетки или он остается на мембранных рецепторах.Нами изучалось взаимодействия туберкулина, меченого ФИТЦ, с перитонеальнымиилимфоидными клетками (рис. 3, 4).

Флуоресцентное свечение отмечалось как в лимфоидных, так и в перитонеальных клетках,т.е. туберкулин взаимодействовал с обоими пулами клеток иммун-

ной системы животных.

Вопрос о возможном проникновении туберкулина в клетки изучалсянами при помощи конфокальной микроскопии (рис. 5, 6).

На рис. 5 и 6 показано, что туберкулин, меченный ФИТЦ, проникал как в ПК, так и в лимфоциты, однако интенсивность флуоресценции в лимфоидных клетках была более низкой по сравнению с перитонеальными.Что может опосредованно говорить о менее интенсивном проникновении туберкулина меченного ФИТЦ в лимфоидные клетки.

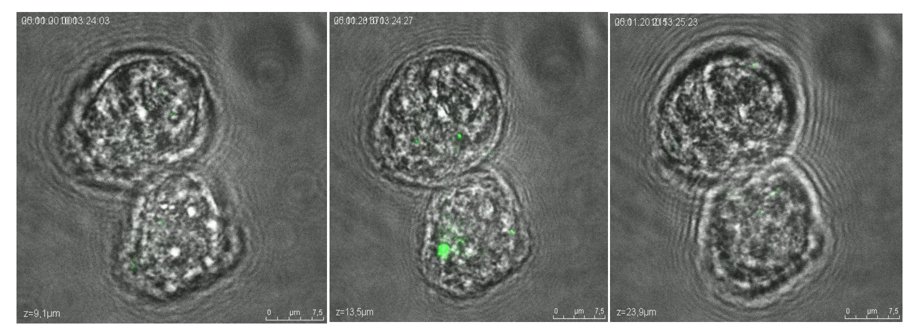


Рис. 5. Конфокальная микроскопия клеток селезенки, культивированных с туберкулином, меченным ФИТЦ (зеленое свечение)

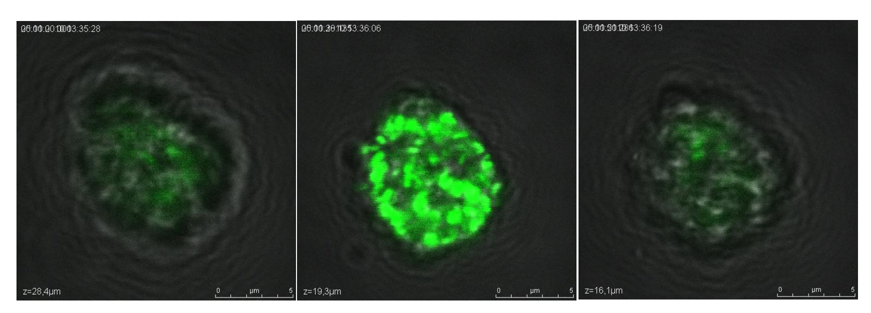


Рис.6. Конфокальная микроскопия перитонеальныхклеток, культивированных с туберкулином, меченным ФИТЦ (зеленое свечение)

Туберкулин, вероятно, проникает в фагоцитирующие инефагоцитирующиеклетки при помощи различных механизмов. Мы провели конъюгированиеКЗ с туберкулином и изучили эффект проникновения данного комплекса в фагоцитирующие и лимфоидные клетки(рис. 7, 8). Так как золотая частица имеет размер 15 нм, онаможет проникать в макрофагипри помощи фагоцитоза, а в нефагоцитирующие клетки при помощи эндоцитоза[11, 5].

Цитотоксический эффект комплекса туберкулин – коллоидное золото на фагоцитыне отмечался; концентрация восстановленного формазана составляла в этом случае 3.1±0.02 мкг/мл, что указывалодаже на некоторый стимулирующий эффект.

Проникновение конъюгатов коллоидного золота с туберкулином в клетки селезенки вызывало угнетение их дыхания, концентрация восстановленного формазана составляла 1.9±0.06 мкг/мл.

Анализируя полученные результаты, мы можем сделать следующие предположения. Полученные нами данные, могут быть, связаны с тем, что туберкулин, попадая в фагосому вместе с КЗ, подвергается протеолизу и теряет свои токсические свойства. Внефагоцитирующие клетки селезенки конъюгаты коллоидного золота с туберкулином проникают при помощи других мембранных рецепторных структур, и в большем количестве, тем самым вызывая угнетение их дыхательной активности.

Следующим этапом нашей работы было изучение адсорбционной активности ПК крысы после их взаимодействия с туберкулином.На рис. 9 показано, что при культивировании ПК с туберкулином,помимо снижения клеточного дыхания, наблюдалосьтакже снижение адгезивной активно-

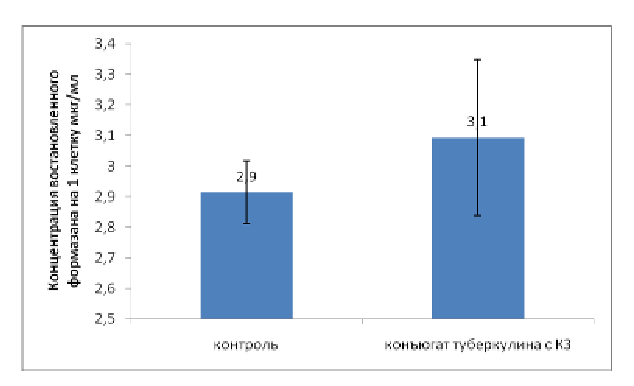


Рис. 7. Концентрация формазана в перитонеальных клетках в тесте с нитротетразолевым синим

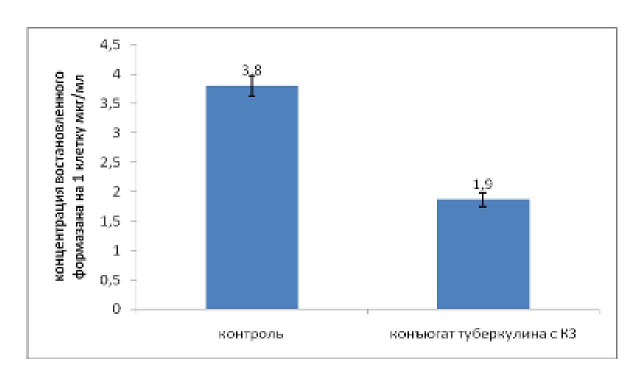


Рис. 8. Концентрация формазана в клетках селезенки в тесте с нитротетразолевым синим (P≤0,05)

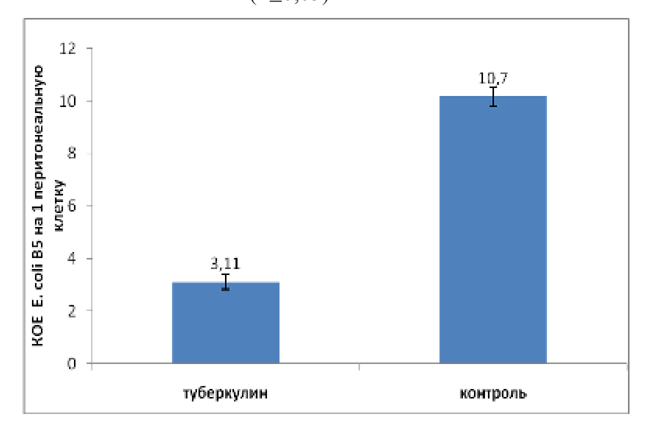


Рис. 9. Адсорбция клеток штамма *E. coli* Б-5 на перитонеальные клетки, КОЕ на одну перитонеальную клетку (P≤0,05)

сти; концентрация микроорганизмов на один фагоцит составляла 3.11±0.16.

В заключение хочется отметить, что, судя по полученным данным, туберкулин обладает ярко выраженным цитотоксическим эффектом в отношении иммунных клеток крови. Этоможет быть связано с тем,что туберкулин является эндотоксином выделяемым микобактерией для подавления защитной системы организма с целью дальнейшей персистенции.

Резюме: В современной науке вопросы, связанные с изучением механизмов взаимодействия низкоиммуногенных антигенов с клетками иммунной системы, остаются малоизученными. В большой степени это связано с антигенами, выделяемыми возбудителями хронических инфекций, т.к. в ряде случаев они могут обладать токсичным эффектом. В работе рассматривалось взаимодействие туберкулина с клетками ретикулоэндотелиальной системы животных. Было установлено, что туберкулин в большей степени воздействует на фагоцитирующиеклетки иммунной системы.Это может быть связано с тем, что туберкулин является эндотоксином выделяемым микобактерией для подавления защитной системы организма с целью дальнейшей персистенции.

SUMMARY

n modern science issues related to the study of mechanisms of interaction of antigens with nizkoimmunogennyh cells of the immune system remain poorly understood. To a large extent this is due to antigens secreted by pathogens of chronic infections, as in some cases they may have a toxic effect. We examined the interaction of tuberculin with cells of the reticuloendothelial system of animals. We found out that the tuberculin largely affects the phagocytic cells of the immune system. This may be due to the fact that the tuberculin is available by mycobacterium endotoxin to suppress the body›s defense system to further persistence.

Keywords: tuberculin, colloidal gold, macrophages, lymphocytes, infiltration

Литература

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щёголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. -М: Наука, 2008. -319 с.
2. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. Иммунология: Практикум. - Киев: Вищашк., 1989.
3. Фримель Г. Иммунологические методы. -М.: Медицина, 1987, -472 с.
4. Bernas T., Dobrucki J.W. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 380. P. 108-116
5. Devika B. Chithrani // Molecular Membrane Biology, - 2010 – V.27(7) – P.299–311
6. Frens, G. // Nature Phys. Sci. – 1973. – V. 241. – P. 20–22.
7. He X.Y., Luo Y.A., Zhang X.G., Liu Y.D., Wang Z.Y., Luo F.Z., Zhang J.P., Wang Q., Yan S.M., Wang Y.J., Ma L.F., Guo J., Dong Y.J., Huang X.Y., Zhuang Y.H. // Scand. J. Infect. Dis. 2008. V. 40. P. 121-126.
8. HeXY, LuoYA, ZhangXG, LiuYD, WangZY, LuoFZ, ZhangJP, WangQ, YanSM, WangYJ, MaLF, GuoJ, DongYJ, HuangXY, ZhuangYH. // ScandJInfectDis. 2007 Sep 6;:1-6
9. Khlebtsov, N.G., Bogatyrev, V.A., Dykman, L.A., and Melnikov, A.G. // J. Coll. Interf. Sci. – 1996. – V. 180. – P. 436–445.
10. Klausen J., Magnusson M., Bengard Andersen A., Koch C. // Scand. J. Immunol. - V.40. – P.345-349. - 1994
11. Matthias Bartneck, Heidrun A. Keul, Gabriele Zwadlo-Klarwasser, and Ju¨rgenGroll // Cells Nano Lett. – 2010 - №10 – P. 59-63
12. Ozekinci T, Ozbek E, Celik Y // J Int Med Res. 2007 Sep-Oct;35(5):696-703.
13. Seishi Kuwabara // The journal of biological chemistry.-1975.-V.250.-№7.-p.2543-2568
14. Stein M, Sela-Razon B, Linder I, Somekh E // Ann N Y Acad Sci. 2007 Aug;1109:229-34

Контактная информации об авторах для переписки

Ласкавый Владислав Николаевич, доктор ветеринарных наук, директор ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН г. Саратов

Богатырев Вланимир Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологийУчреждение Российской академии наук институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

Дыкман Лев Абрамович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Учреждение Российской академии наук институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

Волков Алексей Анатольевич, доктор ветеринарных наук, Заведующий кафедрой терапии, клинической диагностики, фармакологии и радиобиологииФГОУ ВПОСаратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Староверов Сергей Александрович, доктор биологических наук начальник отдела биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХНг. Саратов

Малинин Михаил Леонидович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимии отдела биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН, г. Саратов

Козлов Сергей Васильевич, кандидат ветеринарных наук доцент кафедры терапии, клинической диагностики, фармакологии и радиобиологии. ФГОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, г. Саратов

Габалов Константин Павлович, научный сотрудник лаборатории биохимии отдела

биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХНг. Саратов

Василенко Ольга Александровна, научный сотрудник лаборатории иммунологии отдела биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХНг. Г. Саратов

Фомин Александр Сергеевич, аспирант кафедры терапии, клинической диагностики, фармакологии и радиобиологии, ФГОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Научный руководитель Винников Николай Тимофеевич

Адрес электронной почты для связи с редакцией Kozlov12@inbox.ru

УДК 616:616.98:578

Глотова Т.И., Тугунова Т.Б., Русских В.В., Глотов А.Г.

(Государственное научное учреждение институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского отделения Россельхозакадемии (г. Новосибирск); клиника ДокторВет (г. Новосибирск)

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ В ОПЫТАХ IN VITRO И IN VIVO В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА РИНОТРАХЕИТА КОШЕК

Ключевые слова: ринотрахеит кошек, инфекционное заболевание, противовирусные препараты

Введение

Ринотрахеит кошек - инфекционное заболевание кошек вирусной этиологии, широко распространенное во всем мире. Возбудитель болезни, FeHV-1, относится к подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus. Вызывает у взрослых животных преимущественно поражения органов респираторного тракта и глаз, у молодых – острую респираторную инфекцию, часто с летальным исходом [5…7, 10].

Вирус может формировать состояние латенции, при котором переболевшие животные, остаются пожизненными вирусоносителями. В некоторых питомниках по выращиванию кошек до 97% животных могут иметь специфические антитела к FeHV-1, что свидетельствует об энзоотическом характере инфекции. При таком типе течения болезнь сопровождается периодическими рецидивами с выделением вируса во внешнюю среду. Однако у неимунных животных ринотрахеит протекает значительно тяжелее с вовлечением в инфекционный процесс до 100% животных [9, 11].

При энзоотическом течении, а также при систематической профилактической вакцинации животных, болезнь проявляется в виде слабого респираторного синдрома, а также в виде субклинической или инаппарантной инфекции.

Впервые болезнь описана в США как «синдром поражения верхних дыхательных путей» у котят [8]. В России выделение вируса с установлением его этиологической роли было осуществлено в 1995 г. [4], затем в 2000 г. в Сибири во время вспышки заболевания в питомнике домашних кошек [1].

Разведение высокопородных, племенных животных сопровождается их постоянным экспортом и импортом, что значительно усугубляет эпизоотическую ситуацию по инфекционным болезням.

Распространению возбудителя инфекции среди популяции домашних кошек также способствуют концентрация животных в питомниках по их разведению, перегруппировки, выставки, вязки и другие мероприятия, сопровождающиеся стрессами, при которых происходит реактивация вируса из латентного состояния, сопровождающаяся его репликацией и экскреци-